

SCAC Kampala
Ambassade de France
Ouganda

**Appui scientifique et technique en épidémiologie et sur l'analyse
du risque zoonotique de la tuberculose (*Mycobacterium bovis*,
Mycobacterium tuberculosis) et de la brucellose.**

Mission du 23 mars au 1^{er} avril 2004

Eric Etter



Rapport CIRAD-EMVT n°2004.13

Avril 2004



CIRAD-EMVT
Campus de Baillarguet
34 Montpellier
FRANCE

AUTEUR :

Eric ETTER

ACCES AU DOCUMENT :

CIRAD EMVT Ouganda ; Service de Documentation de Baillarguet

ORGANISME AUTEUR :

CIRAD-EMVT

ETUDE FINANCEE PAR :

Ambassade de France en Ouganda

REFERENCE :

Ordre de mission n°30 05 04 079

AU PROFIT DE :

Ambassade de France en Ouganda

TITRE :

Appui scientifique et technique en épidémiologie et sur l'analyse du risque zoonotique de la tuberculose (*Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*) et de la brucellose.

TYPE D'APPROCHE :

Mission d'expertise scientifique et technique et d'appui méthodologique

DATE ET LIEU DE PUBLICATION :

Avril 2004, Montpellier, France.

PAYS OU REGIONS CONCERNEES :

Ouganda

MOTS CLES :

Tuberculose – Brucellose - Zoonose - Epidémiologie - Santé animale – Production animale - Ouganda

Remerciements :

Je tiens à remercier S.E. JB Thiant, Ambassadeur de France, pour l'intérêt qu'il porte sur l'élevage laitier à Mbarara et plus particulièrement sur l'implication du Cirad dans la composante santé publique avec l'étude de l'aspect zoonotique la brucellose et de la tuberculose.

Je remercie spécialement Mme Baherle, chef du SCAC de Kampala, pour m'avoir reçu chaleureusement et pour le soutien marqué qu'elle porte à l'action du Cirad en Ouganda.

« Last but not least », Merci beaucoup à Patrice Grimaud, agent du Cirad en poste en Ouganda, pour son accueil familial, pour l'organisation sans faille de cette courte mission et pour l'ensemble du travail réalisé dans une ambiance très confraternelle.

Résumé

Cette mission est la deuxième du Cirad-Emvt en Ouganda cette année 2004. Cette mission a été programmée suite à une décision commune prise entre l'ambassade de France en Ouganda et l'agent Cirad-Emvt en place en Ouganda. Son objectif était de faire une première évaluation sur la faisabilité technique et institutionnelle d'une analyse de risque sur deux zoonoses majeures, la tuberculose et la brucellose, cette évaluation intéressant la composante 2 du projet FSP « Concertation agricole et structuration des filières ». Dans cette optique, il convenait notamment de catalyser le travail de PhD d'un chercheur ougandais de l'Université de Mbarara. Ainsi outre un approfondissement sur la problématique abordée dans ce PhD, il convenait de tracer les lignes directrices qui pourraient constituer l'architecture de cette thèse, d'activer le démarrage du travail en particulier en rencontrant les différents partenaires potentiels désireux de s'inscrire dans ce travail. Parallèlement une réflexion devait être menée sur l'aspect zoonotique de la brucellose. Il s'agissait également d'apporter un appui scientifique dans le cadre de formation en épidémiologie à mettre en place par l'agent Cirad au sein des Universités de Makéréré et de Mbarara.

Sommaire

Remerciements :.....	2
Résumé.....	3
Sommaire.....	4
Liste de personnes rencontrées :.....	6
Programme de la mission	7
Liste des abréviations	8
1. Rappel du Contexte.....	9
2. Objectifs de la mission (cf. Annexe "Termes de référence").....	9
3. Présentation générale de la lutte et du contrôle de la Tuberculose et de la	
Brucellose :	10
3.1. Les Enquêtes épidémiologiques	10
3.2. Mise en place d'un réseau d'épidémiosurveillance concernant ces zoonoses.....	10
3.3. Politique prophylactique	11
4. Evaluation du sujet de thèse de Frederick Byarugaba.....	12
5. Propositions	13
5.1. Hypothèses de travail et axes de recherche	13
5.2. Le diagnostic étiologique de la tuberculose, méthodes et faisabilité	15
5.2.1. Les prélèvements.....	15
5.2.2. Tests phénotypiques.....	15
5.2.3. Sérologie.....	17
5.2.4. Biologie moléculaire.....	18
5.3. Grandes lignes de l'analyse du risque pour la santé publique des deux zoonoses	
Tuberculose et Brucellose.....	19
5.3.1. Travail initial dans le cadre du PhD du Dr Byarugaba sur la tuberculose dans le	
district de Mbarara :	19
5.3.2. Initiation d'un travail du même type sur la Brucellose avec l'Université de	
Makérére (MSc)	19
5.4. Structuration des collaborations potentielles	20
5.5. Réseau d'épidémiosurveillance et tuberculose.....	22
5.6. Prophylaxie en Ouganda	22
5.7. Besoins en formation.....	23
5.8. Besoins en infrastructure et en matériel	23
6. Chronogramme prévisionnel	24
7. Planning :	26
8. Schéma décisionnel concernant les actions de recherche sur la Tuberculose en	
Ouganda.....	27
9. Propositions concernant les contributions du Cirad	28
ANNEXES	29

Liste de personnes rencontrées :

Ambassade de France en Ouganda ; Service de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC)

- S.E. Jean-Bernard Thiant ambassadeur de France en Ouganda
- Mme Michèle Baherle Chef du SCAC

FSP « Concertation agricole et structuration des filières »

- Alban Bellinguez responsable et coordinateur du FSP
- Leonard Mugarura et Emmanuel Mugozi, CTO Mbarara

Université de Mbarara

- Professor Kayanja Vice chancellor of the University
- Dr Frederick Byarugaba lecturer in the faculty

District Veterinary Office

- Dr Barigye responsable du DVO de Mbarara

Epicentre

- Dr Patrice Piola médecin épidémiologiste représentant Epicentre en Ouganda
- Dr Laurence Ahoua médecin épidémiologiste responsable du volet HIV au sein d'Epicentre Ouganda
- Dr Carole Fogg médecin épidémiologiste basée à Mbarara

Ministry of Agriculture Animal Industry and Fisheries (MAAIF) / PACE

- Dr Risto Heinonen, conseiller technique du Pace en Ouganda
- Dr Rose Ademun, vétérinaire épidémiologiste responsable du laboratoire

National Tuberculosis and Leprosy Programme

- M. Hatanga directeur du laboratoire

Joint Clinical Research Center

- Mme Susan Kayes directrice du laboratoire de recherche sur la tuberculose
- M. Moses Joloba responsable de l'unité PCR du JCRC basé à la faculté de médecine de l'université de Makérére

Université de Makérére

- Prof. Eli Katunguka-Rwakishaya doyen de la Faculté de Médecine Vétérinaire
- Dr Sserunjoji département des Sciences Alimentaires

Programme de la mission

Mercredi 24 mars 04

- ⇒ Départ pour Kampala via Bruxelles
- ⇒ Arrivée à l'aéroport d'Entebbe, reçu par Patrice Grimaud

Jeudi 25 mars 04

- ⇒ Déplacement à Mbarara
- ⇒ Réunion avec Alban Bellinguez
- ⇒ Réunion de travail avec Frederick Byarugaba

Vendredi 26 mars 04

- ⇒ Rencontre avec le DVO
- ⇒ Entretien avec le Vice Chancelor de l'Université de Mbarara
- ⇒ Visite du Tuberculosis Ward et entretien avec l'infirmière responsable du pavillon
- ⇒ Entretien avec Carole Fogg
- ⇒ Visite du laboratoire d'Epicentre dans l'hôpital de Mbarara
- ⇒ Réunion de travail avec Frederick Byarugaba
- ⇒ Repas avec Mme Baherle

Samedi 27 mars 04

- ⇒ Réunion avec les responsables de la coopérative laitière Sumca
- ⇒ Visite de trois élevages
- ⇒ Retour à Kampala

Dimanche 28 mars 04

- ⇒ Séance de travail avec Patrice Grimaud

Lundi 29 mars 04

- ⇒ Réunion de travail à l'ambassade avec Epicentre
- ⇒ Entretien avec Alban Bellinguez
- ⇒ Réunion à Entebbe avec Risto Heinonen et Rose Ademun du Pace
- ⇒ Retour Kampala

Mardi 30 mars 04

- ⇒ Entretien avec le directeur du laboratoire du National TB Programme et du JCRC
- ⇒ Visite des laboratoires du Nat. TB Prgr et du JCRC
- ⇒ Réunion de travail avec Frederick Byarugaba
- ⇒ Séance de travail avec Patrice Grimaud

Mercredi 31 mars 04

- ⇒ Entretien avec de l'Université de Makéréré
- ⇒ Séance de travail avec Alban Bellinguez
- ⇒ Restitution de la mission à S.E. M. Thiant, Ambassadeur de France
- ⇒ Séance de travail avec Mme Baherle
- ⇒ Départ pour Bruxelles

Jeudi 01 avril 04

- ⇒ Départ pour Montpellier via Marseille
- ⇒ Arrivée à Montpellier

Liste des abréviations

ATD	Assistant Technique Direct
CIRAD	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CTO	Cellule Technique opérationnelle
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EMVT	Département élevage et médecine vétérinaire du CIRAD
FA	Fièvre aphteuse
FSP	Fonds de Solidarité Prioritaire
InVS	Institut de veille sanitaire
JCRC	Joint Clinical Research Center
MAE	Ministère des Affaires Etrangères
MAAIF	Ministry of Agriculture Animal Industry and Fisheries
ONG	Organisation Non Gouvernementale
PACE	Pan African Programme for the Control of Epizootics
PPA	Peste Porcine Africaine
RP	Rinder Pest (Peste Bovine)
SCAC	Service de coopération et d'action culturelle
SIG	Système d'information Géographique
SUMPCA	South-Western Uganda Milk Producer Cooperative Association
UE	Union Européenne

1. Rappel du Contexte

Depuis 1999 le Cirad-Emvt s'est investi dans l'étude épidémiologique de la tuberculose et de la brucellose dans le bassin laitier de Mbarara. Une étude préliminaire a été conduite en 1999 par Stéphanie Devaux, ont suivi les travaux de Julien Chalimbaud (2000) et Vincent Castel (2001). L'un des résultats majeurs des études qui ont été faites dans les élevages du bassin de Mbarara est la forte prévalence de ces deux zoonoses, la tuberculose et la brucellose, avec des pourcentages respectifs de prévalences troupeau proches de 75 et 56 %, et de prévalences animal de 6 et 16 %. De tels chiffres ont alerté les pouvoirs politiques aux niveaux les plus hauts, qui ont exprimé le souhait de connaître la part de ces maladies animales dans les pathologies humaines, et cela dans un contexte où la tuberculose pose un problème de santé publique majeur en tant que maladie opportuniste chez les malades infectés par le virus du sida.

Très sensible aux conclusions des travaux du Cirad sur la tuberculose animale ainsi qu'à l'étude du lien tuberculose bovine / tuberculose humaine, le Vice-Chancelier de l'Université de Mbarara a confié un sujet de doctorat à l'un de ses enseignants du service de microbiologie, le docteur vétérinaire Frederick Byarugaba, qu'il a placé sous la supervision du chercheur Cirad en poste en Ouganda. Un document de présentation a été élaboré, intitulé 'Etude des facteurs influençant la qualité et l'hygiène des produits bovins (viande et lait) : *Mycobacterium bovis* joue-t-il un rôle dans l'étiologie de la tuberculose humaine dans le district de Mbarara ?'.

2. Objectifs de la mission (cf. Annexe "Termes de référence")

L'objectif de cette mission est, pour l'expert du Cirad-Emvt, d'apporter un appui scientifique et technique en particulier dans les domaines suivants :

- Evaluation du sujet de thèse d'un PhD à l'Université de Mbarara
- Elaboration d'un protocole d'étude du risque de la transmission de la tuberculose et de la brucellose à l'homme
- Identification des partenaires de l'étude et des tâches dévolues à chacun d'entre eux
- Evaluation des outils existants et des besoins pour la réalisation de l'étude
- Etude de l'insertion des outils identifiés dans la mise en place d'un réseau d'épidémio-surveillance à l'échelle du district
- Formation :
 - Aide au ciradien en poste dans le cadre de son affectation à l'Université de Mbarara
 - présentation de support de conférences en épidémiosurveillance, épidémiologie et analyse du risque.

3. Présentation générale de la lutte et du contrôle de la Tuberculose et de la Brucellose :

Dans une politique de contrôle et de lutte contre une maladie animale il faut tout d'abord récolter des informations sur cette maladie, comprendre son mécanisme, sa propagation et envisager des mesures permettant sinon son éradication du moins d'arrêter sa progression voire de diminuer sa prévalence. Ces mesures sont discutées entre les décideurs, les financiers (qui peuvent être différents des décideurs), les acteurs de terrain et les scientifiques en fonction de différents paramètres de faisabilité technique, économique mais aussi sociale.

La première chose à faire est donc de récolter des données. Celles-ci permettent d'alimenter la réflexion. Pour ce faire on peut soit récolter les données de façon passive c'est-à-dire qu'elle sont fournies spontanément sans démarche spécifique, soit de façon active avec une organisation spécifique dans le but exclusif de surveillance.

Par ailleurs l'organisation de la récolte des données peut passer soit par la mise en place des réseaux d'épidémiosurveillance (récolte active ou passive) qui ont un caractère pérenne mais ne permettent qu'un traitement descriptif, soit envisager des enquêtes épidémiologiques (récolte uniquement active) qui ont un caractère limité dans le temps mais peuvent être orientées de manière plus analytique.

3.1. Les Enquêtes épidémiologiques

Pour comprendre la dynamique d'une maladie ainsi que son fonctionnement il est nécessaire de mettre en place des enquêtes épidémiologiques. Celles-ci permettent à travers l'analyse des données qu'elles produisent de constater l'ampleur de la maladie mais elles peuvent également avoir une visée explicative et ainsi relier la maladie avec des facteurs de risque.

3.2. Mise en place d'un réseau d'épidémiosurveillance concernant ces zoonoses

L'épidémiosurveillance est « une méthode fondée sur les enregistrements en continu permettant de suivre l'état de santé ou les facteurs de risque d'une population définie, en particulier de déceler l'apparition de processus pathologiques et d'en étudier le développement dans le temps et dans l'espace, en vue de l'adoption de mesures appropriées de lutte » (Toma et al., 2001). L'épidémiosurveillance se déroule selon 4 niveaux différents :

- Récolte de données sur la maladie
- Centralisation des données
- Traitement des données
- Communication sur les résultats

Pour fonctionner il faut donc plusieurs structures reliées entre elles au sein de ce qu'il convient d'appeler un réseau. Il y aura donc une structure travaillant sur le terrain, au contact avec les éleveurs qui aura le rôle de réaliser voire d'organiser la récolte des données (prélèvements ou autre). Il faudra ensuite un système pour faire remonter soit les prélèvements soit les résultats (si les analyses ont lieu localement) au niveau central où ils seront analysés ou traités. Un feed back doit être organisé afin de conserver une harmonie et une motivation du réseau.

L'organisation et la structuration des différentes entités travaillant conjointement (service vétérinaire, groupement d'éleveurs, laboratoire) dépendra du contexte et de la maladie étudiée.

3.3. Politique prophylactique

La prophylaxie correspond à l'ensemble des mesures médicales et hygiéniques visant à prévenir l'apparition d'une maladie, à en limiter le développement et à en assurer la disparition (Toma et al., 2001). Il faut distinguer la prophylaxie médicale (vaccination, etc.) de la prophylaxie sanitaire (dépistage, quarantaine, abattage, désinfection, contrôle des mouvements des animaux, etc.).

La prophylaxie sanitaire ne peut être envisagée qu'en milieu peu infecté ou faiblement menacé (prévalence faible ou nulle), ceci est dû à trois contraintes majeures : technique, financière et humaine.

En milieu fortement infecté, ces mesures fondées sur le principe "dépistage-élimination" des sujets infectés sont fortement discutables. De même les mesures de protection deviennent illusoires compte tenu des relations étroites entre les cheptels par le jeu des transactions commerciales et des contacts divers (échanges, gardiennage, points d'eau et itinéraires communs...).

➤ Pour la tuberculose il faut noter concernant la prophylaxie médicale que les résultats obtenus suite à l'utilisation du B.C.G. ont été très insuffisants, pour trois raisons :

- La vaccination limite les risques d'infection, mais elle ne supprime pas le risque qu'un animal vacciné puisse devenir excréteur ;
- Les propriétaires, sachant leurs animaux vaccinés, négligent les prescriptions sanitaires de prévention, favorisant ainsi, paradoxalement, leur contamination.
- Il devient impossible de distinguer lors d'un dépistage tuberculinique les animaux vaccinés des animaux infectés.

Chez l'homme, cet inconvénient est contourné par la mise en œuvre d'examens complémentaires lourds et coûteux (hospitalisation, prélèvements bactériologiques). Par conséquent, le recours au B.C.G. entre en conflit avec la prophylaxie sanitaire. C'est pourquoi en médecine vétérinaire son usage est soit proscrit, soit envisagé seulement dans les conditions particulières de pays connaissant une forte prévalence de tuberculose et pour lesquels il est impossible d'envisager une prophylaxie sanitaire, pour des raisons économiques ou organisationnelles, ou bien encore dans des circonstances tout à fait exceptionnelles (Benet 2001).

➤ Dans les conditions de milieu fortement infecté le recours à la prophylaxie médicale pour lutter contre la brucellose devient une nécessité. Ainsi, la vaccination, appliquée sur les jeunes animaux, comme sur les adultes, peut présenter un double intérêt : réduire les risques d'infection des bovins exposés à la contamination et, surtout, lutter contre la brucellose maladie, en diminuant le pourcentage d'avortements dans les cheptels infectés. La protection conférée reste néanmoins relative et peut être facilement vaincue lors de contamination massive. Il est impossible, en outre, de préconiser dans ces cheptels une prophylaxie sanitaire, fondée sur le dépistage sérologique.

En milieu peu infecté, il est possible d'envisager un protocole de vaccination compatible avec une prophylaxie sanitaire fondée sur le dépistage sérologique et l'élimination des bovins réagissant donc potentiellement dangereux : la vaccination des jeunes femelles bovines (avant la puberté, entre 4 et 6 mois) répond à ces exigences.

Concernant la brucellose le vaccin qui fut utilisé en France avant son interdiction (passage à la prophylaxie sanitaire) est un vaccin modifié préparé à partir de la souche B19 (Buck19). Il possède une virulence résiduelle et son utilisation doit être

étroitement contrôlée (risque pour l'homme en cas d'inoculation accidentelle et effet secondaire chez le bovin adulte).

4. Evaluation du sujet de thèse de Frederick Byugarugaba

Suite à la présentation du protocole initial, l'intitulé du sujet a été révisé avec le Dr Byarugaba et une proposition d'architecture de la thèse a été mise en place. Cf Annexes.

Ainsi il a été souligné l'importance de la définition d'une problématique plus générale sur le sujet afin de pouvoir répondre aux ambitions scientifiques inhérentes à un travail de thèse. Il est donc nécessaire d'aller au-delà de la simple étiologie de la tuberculose humaine et d'appréhender l'aspect zoonotique de cette maladie d'une façon plus globale.

Ainsi trois parties peuvent être arbitrairement distinguées :

- la partie tuberculose humaine (prélèvements et enquêtes à l'hôpital de Mbarara) qui sera l'angle d'attaque de la thèse
- à partir de là il conviendra d'aborder la partie tuberculose animale (enquêtes dans les élevages, questionnaires auprès des éleveurs, enquête rétrospective sur l'environnement des malades humains).
- Enfin une partie production animale devra être explorée (étude de filière, traçabilité, comportements alimentaires...)

Ce découpage n'est là que pour permettre une meilleure structuration du travail et des différents protocoles à mettre en place, il ne doit en aucun cas subsister dans l'approche intellectuelle de la problématique. Il s'agit au contraire de mettre en rapport le volet humain avec l'animal et les produits qui en sont issus, ceci afin de mettre en évidence des facteurs de risques ainsi que les populations et les comportements à risques. Cette décomposition en facteurs de risques doit ensuite faire place à une reconstruction permettant une évaluation d'ensemble du risque zoonotique de la tuberculose. La zone de travail se limitera au district de Mbarara.

D'autre part il fut également expliqué qu'un travail de thèse s'inscrit dans une certaine durée permettant d'émettre des hypothèses, d'élaborer des protocoles permettant d'y répondre, d'assurer la réalisation et le suivi de ces protocoles, d'analyser les résultats obtenus et de les discuter, d'avancer des réponses ainsi que de nouvelles questions de recherche... La durée de 18 mois tout d'abord proposée par le Dr Byarugaba fut donc modifiée pour une durée de 30 à 36 mois. Ce point fut également abordé avec le vice recteur de l'université de Mbarara. Le premier travail sera donc sur une période la plus courte possible (12 mois environ) l'étude sur l'étiologie de la tuberculose humaine au sein de l'hôpital de Mbarara. Ceci dit il n'est pas inconcevable qu'en parallèle puisse se dérouler une large enquête exploratoire auprès des éleveurs de bovins dans le district de Mbarara afin de commencer à explorer le volet animal.

Remarque 1 : Compte tenu de la durée de la présence du chercheur du Cirad actuellement en poste en Ouganda d'une part et d'autre part du projet FSP, il convient de bien prévenir l'impétrant des risques de difficultés concernant ses frais de fonctionnement (enquêtes, analyses...) et son encadrement. Il est donc important que l'ensemble des travaux de terrain et manipulations de laboratoire soit programmé de façon la plus détaillée possible avec des objectifs bien définis et des échéances claires. La rémunération du thésard étant assurée par l'université, et la communication pouvant être assurée par internet, les analyses

des résultats et la rédaction de la thèse pourront se poursuivre au-delà des durées précédemment évoquées.

Remarque 2 : Compte tenu de la formation initiale du Dr Byarugaba (vétérinaire) ainsi que de l'environnement dans lequel il se trouve (Université de Mbarara) il pourrait être intéressant pour lui de suivre certaines formations complémentaires (épidémiologie, statistiques) si le besoin s'en fait sentir. Ces formations pourraient être trouvées au sein de l'université même, au sein de l'université de Makéréré (Kampala) ou plus généralement être apportées par des intervenants extérieurs (Cirad-Emvt). Des formations à distance telles que celles dispensées par le CESAM (Centre d'Enseignement de la Statistiques Appliquées à la Médecine) ou par L'ENVA/CIRAD en épidémiologie animale pourraient également être à envisager.

5. Propositions

5.1. Hypothèses de travail et axes de recherche

➤ Evaluation générale du risque zoonotique de la tuberculose bovine :

Il s'agit tout d'abord d'avoir une vision générale sur le risque de la tuberculose bovine en tant que maladie transmissible à l'homme. Pour cela il convient de réaliser une synthèse bibliographique aussi complète que possible sur le sujet. Suite à cette synthèse il doit être possible de connaître l'état d'avancement des connaissances sur les possibilités de franchissement de la "barrière d'espèce" de *M. bovis* mais aussi de *M. tuberculosis*, sur les différentes techniques de diagnostic différentiel entre ces deux mycobactéries, sur les recherches de facteurs de risques associés à *M. bovis* chez les humains et sur les premiers travaux permettant d'apprécier ce risque.

➤ Approche analytique : évaluation des facteurs de risque et des populations à risque

- Facteurs de risque et élevage : il s'agit dans cette partie du travail d'essayer de faire ressortir des facteurs liant de façon significative les cas humains de tuberculose à *M. bovis* et les cas de tuberculose bovine. Une première enquête auprès des patients infectés par *M. bovis* doit permettre de faire ressortir certains facteurs de risque. Pour ce faire outre ces patients il faudra mener l'enquête auprès d'un lot témoin afin d'avoir un protocole du type « Cas-Témoins ». Dans ce travail on pourra tout d'abord approcher les facteurs de risque par une analyse multivariée descriptive, avant de déterminer les odds ratio qui leur sont associés. Une fois ces facteurs identifiés, il faut encore faire la preuve qu'ils ont un caractère causal. Pour cela il faut outre étudier l'impact de *M. bovis* dans la population humaine, revenir sur le terrain et vérifier si les facteurs de risques sont bien associés de façon causal à la tuberculose humaine à *M. bovis* (absence de facteur tiers, antériorité...), ce travail peut être mener dans le district de Mbarara selon un protocole d'enquête du type « Exposé – Non exposé ».

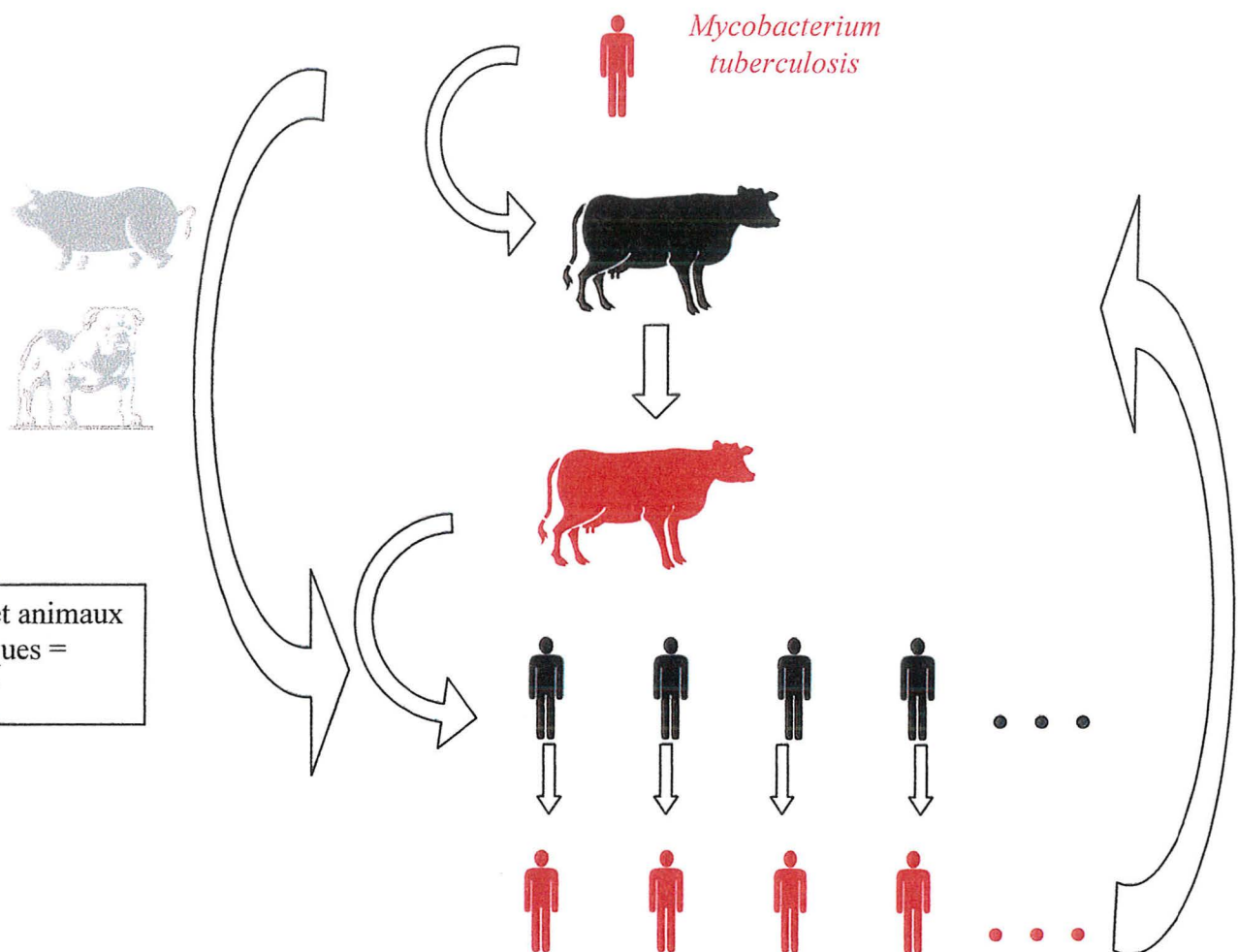
Remarque : L'étude des cas de tuberculose humaine au sein de l'hôpital de Mbarara pour évaluer l'impact de *M. bovis* comporte un biais important qu'il faudra prendre en compte lors de l'analyse des résultats. En effet, ne sont pris en considération que les personnes se présentant à l'hôpital, or il semble que les cas de tuberculose humaine dus à *M. bovis* sont classiquement extra-pulmonaires, le diagnostic n'est donc pas toujours évident et les personnes concernées ne consultent pas forcément. On risque donc d'avoir une certaine sous-estimation du

nombre de cas. Ceci justifie également l'enquête transversale qui permettra d'avoir une approche différente des malades.

- Facteurs de risque et productions animales : l'étude des filières lait et filière viande en rapport avec les cas de tuberculose humaine pourra aussi mettre en évidence la présence ou l'absence de lien. Cette étude des filières devra permettre également de pointer les points critiques et de proposer des scénarii de contrôle (étude HACCP).

➤ Evaluation de l'impact de *M. tuberculosis* dans le cheptel bovin

La transmission de la tuberculose outre de l'animal à l'homme peut également passer de l'homme à l'animal. On peut ainsi avoir un cycle complet entre l'homme et ses animaux de rentes voire ses animaux domestiques. Ainsi il peut être intéressant de rechercher l'étiologie des cas de tuberculose bovine afin de vérifier la probabilité d'avoir un cycle entre l'homme et les animaux avec *M. tuberculosis*. Dans cette éventualité on aurait des animaux infestés par un ou plusieurs cas humains pouvant ensuite amplifier la dissémination de la tuberculose à *M. tuberculosis*, cette amplification serait alors due à la distribution des produits animaux (lait ; viande) plutôt qu'au contact ou au confinement des hommes avec les animaux (système d'élevage plutôt extensif).



- **Brucellose et santé publique : de la méconnaissance de la brucellose dans les syndromes fébriles au sein la population humaine**
 Les syndromes fébriles en zone paludéenne sont généralement associés au paludisme sans qu'une véritable recherche étiologique soit effectuée (dans les cas bénins). Parallèlement, la clinique de la brucellose humaine associe une triade classique mais inconstante "fièvre ondulante sudoro-algique" pour les formes (ou durant la phase) septicémiques. Lors de brucellose subaiguë on observe alors des localisations viscérales avec possibilité d'accès fébrile, n'importe quel viscère peut être touché. La plupart du temps l'infection due à *B. abortus* est à l'origine de formes mineures avec un état pseudo grippal transitoire parfois associé à des formes à localisation viscérale (splénomégalie...). Ceci cependant ne prend pas en compte le statut immunitaire de l'individu. Dans les cas d'immunodéficience ces formes peuvent être alors beaucoup plus graves. Par ailleurs, sans minimiser l'importance médicale des infections à *Brucella abortus* (origine bovine), il faut noter la gravité chez l'homme de l'infection à *B. melitensis* contractée auprès du réservoir ovin et caprin. Il paraît donc opportun d'initier un travail de recherche sur l'étiologie des accès fébriles en particulier chez les éleveurs. Le protocole de l'étude préliminaire (étudiant en Master) reste encore à élaborer.
- **Epidémiologie analytique et synthétique :**
 A l'issus de cette première étude et en fonction des résultats obtenus il pourra être intéressant de mener un travail de recherche sur les causalités et sur l'élaboration d'un modèle explicatif de la brucellose en tant que zoonose.

5.2. Le diagnostic étiologique de la tuberculose, méthodes et faisabilité

Il faudra au cours de ce paragraphe bien distinguer les tests de diagnostic permettant de mettre en évidence une tuberculose en particulier humaine (complexe *M. tuberculosis*) des tests qui permettront de différencier au sein de ce complexe le bacille *M. bovis*.

5.2.1. Les prélèvements

En médecine humaine le type de prélèvements dépendra de l'expression clinique de la tuberculose. S'il s'agit d'une tuberculose pulmonaire, on prélève l'expectoration obtenue par un crachat ou par un tubage gastrique. On peut aussi obtenir les sécrétions bronchiques au cours d'une fibroscopie par aspiration, brossage ou lavage broncho-alvéolaire. S'il s'agit d'une tuberculose extra-pulmonaire, on recueille, suivant les cas, les liquides de ponction, le liquide céphalo-rachidien (formes méningées) les urines ou le pus.

5.2.2. Tests phénotypiques

➤ Examens optiques

La recherche des mycobactéries au microscope est réalisée après coloration de Ziehl ou coloration à l'auramine (cf. annexe) sur des étalements du produit pathologique effectués directement ou après homogénéisation. Il ne faut pas oublier qu'en plus du *Mycobacterium tuberculosis*, d'autres mycobactéries (*Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium fortuitum*, etc.) peuvent être observées au

microscope sans que l'on puisse les distinguer à cette étape. L'identification ultérieure est assurée par les méthodes de culture ou d'amplification génique.

➤ Culture

En France la confirmation des cas de tuberculose permettant la dénomination de cas confirmé n'est acceptée que si la maladie due à une mycobactérie du complexe tuberculosis est prouvée par la culture.

Elle est donc indispensable comme préalable la plupart des diagnostics. On ensemence le produit, éventuellement concentré et décontaminé (homogénéisation) sur milieu solide le plus souvent milieu de Loewenstein-Jensen. Les milieux de culture varient en fonction des ingrédients qui sont ajoutés à la gélose. Une fois que les colonies sont formées, on procède à leur examen visuel et microscopique et à des tests d'identification biochimique ou de chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Il s'écoule en moyenne quatre à six semaines entre la mise en culture et l'obtention des premiers résultats. Les laboratoires des centres hospitaliers attendent de huit à douze semaines avant de conclure à une absence de croissance.

De plus en plus, les centres hospitaliers utilisent un milieu liquide qui permet la détection du bacille tuberculeux une à deux semaines plus tôt que les systèmes conventionnels (cf annexe). **Ce type de culture (milieu liquide) nécessite cependant un matériel très coûteux et n'est qu'un préalable avant la distinction de *M. bovis* au sein du complexe *Mycobacterium tuberculosis*.**

➤ Identification

Elle se fonde sur la morphologie, l'aspect des colonies et les caractéristiques biochimiques (niacine, nitrate réductase...)

	PIGMENT		CULTURE				NIAC	CATALASE		NIT	TCH
	P	S	R	E	36°C	42°C		22°C	70°C		
<i>tuberculosis</i>	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>bovis</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>africanum</i>	-	-	-	-	+	-	V	+	-	V	V
BCG	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>kansasii</i>	+	-	-	+	+	-	-	++	+	+	+
<i>marinum</i>	+	-	+	-	F	-	V	++	F	-	+
<i>gordonae</i>	+	+	-	+	+	-	-	++	+	-	+
<i>xenopi</i>	+	+	-	+	+	+	-	++	+	-	+
<i>scrofulaceum</i>	+	+	-	+	+	-	-	++	+	-	+
<i>avium</i>	-	-	-	+	+	V	-	++	+	-	+
<i>ulcerans</i>	-	-	-	+	-	-	-	++	+	-	+
<i>fortuitum</i>	-	-	+	+	+	+	-	++	+	+	+
<i>smegmatis</i>	-	-	+	+	+	+	-	++	-	+	+

+ = test positif, - = test négatif, v = résultat variable, F = faiblement positif

P = photochromogène, S = scotochromogène, R = colonies R, E = colonies eugoniques, 36°C = culture à 36°C, 42°C = culture à 42°C, Niac = production d'acide nicotinique, 22°C = active à 22°C, 70°C = active à 70°C, NIT = réduction des nitrates en nitrites, TCH = culture en présence d'acide thiophène 2 carboxylique.

➤ Antibiogramme

La résistance des bacilles de la tuberculose aux antibiotiques est la conséquence de mutations. Il faut donc détecter, dans la population de bacilles infectant un malade, les mutants résistants à des concentrations d'antibiotiques voisines de celles obtenues in vivo au cours des traitements. Si la proportion de mutants résistants dépasse le taux de 1%, le traitement risque d'être inefficace. **Des résistances ou des sensibilités particulières à certains antituberculeux peuvent être caractéristiques de certaines mycobactéries.**

➤ Autres techniques d'isolement et d'identification

Le diagnostic biologique d'infection à mycobactéries nécessite donc de longs délais. Ces dernières années, des méthodes rapides se sont développées (cf annexe). **Ces différentes techniques récentes sont cependant très coûteuses et ne permettent pas de différencier *M. bovis* du complexe *M. tuberculosis*.**

5.2.3. Sérologie

La sérologie n'est à considérer à l'heure actuelle que comme une technique de diagnostic du complexe tuberculosis.

➤ Méthodes immunologiques

La détection d'antigènes mycobactériens s'est révélée décevante à cause de nombreuses réactions croisées. L'amélioration des connaissances sur ces antigènes et la production d'anticorps monoclonaux plus spécifiques permettent d'espérer des performances améliorées.

La mise en évidence d'une allergie tuberculinique par des tests cutanés est connue et appliquée depuis longtemps. Elle détecte les sujets sensibilisés, malades ou non.

Le sérodiagnostic par hémagglutination passive mis au point en 1948 par Middlebrook et Dubos n'a guère été utilisé en raison de son manque de sensibilité et de spécificité. L'utilisation de préparations antigéniques purifiées n'a amélioré ni la sensibilité ni la spécificité de la méthode.

Selon l'Institut de Veille Sanitaire "les tests sérologiques actuellement commercialisés sont d'interprétation incertaine : leur emploi n'est pas recommandé en l'état actuel". Ils ne supplantent actuellement pas les diagnostics par microscopie (Perkins and Kritski, 2002 ; Vincent V. Comm. Pers.)

➤ Interferon Gamma

Il existe un test commercial appelé QuantiFERON-TB. Ce test permet le diagnostic de la tuberculose en mesurant la réaction immunitaire à médiation cellulaire d'un individu tuberculeux. Les individus atteints par *M. tuberculosis* ont des lymphocytes dans leur sang qui reconnaissent les antigènes spécifiques des mycobactéries dans les préparations de tuberculine à protéine purifié (PPD) suite à une exposition antérieure des lymphocytes à la tuberculose de *M. tuberculosis*. Ce processus de reconnaissance par les lymphocytes induit la génération et la sécrétion d'une cytokine, l'interféron-gamma (IFN- γ). Le test QuantiFERON-TB se base sur la stimulation des cellules de T précédemment sensibilisées par exposition aux mycobactéries. Il permet de mesurer dans les microplaques 24-puits la quantité d'IFN- γ sécrétée par les lymphocytes sensibilisés par *M. tuberculosis* en réponse aux antigènes de stimulation.

Le test QuantiFERON-TB est donc un test diagnostique d'aide à la détection de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis*. Son avantage diagnostique par rapport aux

méthodes classiques n'est pas prouvé (cf annexe). **Il permet de différencier l'infection par le complexe *M. tuberculosis* de celle par *M. avium* mais ne permet pas de faire la différence entre les différents bacilles au sein du complexe.**

5.2.4. Biologie moléculaire

- Méthodes d'amplification génique

Les méthodes d'amplification génique consistent à amplifier et détecter une séquence nucléique spécifique. Le processus est extraordinairement puissant (le seuil de sensibilité in vitro est d'une molécule d'A.D.N.) et rapide, car il s'affranchit du temps de génération des bacilles en ne mettant en œuvre que des réactions enzymatiques. Ces méthodes ont donc la potentialité d'identifier spécifiquement les bacilles de la tuberculose en quelques heures, directement dans les échantillons cliniques sans que le préalable d'une culture bactérienne soit nécessaire. Elles regroupent différentes techniques variant par leurs procédés d'amplification. Les plus répandues sont la réaction en chaîne par polymérase (**P.C.R. cf annexe**), la réaction en chaîne par ligase (L.C.R.), l'amplification par déplacement de brin (S.D.A.), l'amplification isothermique d'A.R.N. via un intermédiaire d'A.D.N.

L'application de ces méthodes à la mycobactériologie clinique était donc très prometteuse quant à la réduction des délais nécessaires aux examens bactériologiques. **Cependant, ces techniques appliquées directement aux échantillons cliniques, n'ont pas fait la preuve de leur efficacité et présentent des défauts de sensibilité comme de spécificité.** La sensibilité varie fortement selon que les prélèvements sont positifs ou négatifs à l'examen microscopique. De 97-95 % pour les prélèvements positifs, la sensibilité chute à 75-60 % pour les prélèvements négatifs. Quant à la spécificité, elle dépasse rarement 97% d'où une valeur prédictive de 5% à 75% selon que l'incidence de la tuberculose dans la population testée varie de 0,2 à 10% (données InVS).

L'indication de la méthode d'amplification génique est limitée en France aux cas de forte suspicion d'infection viscérale, et seulement en cas d'examen direct négatif. Ces tests font l'objet de recherches intensives en vue d'améliorer leurs performances. Aujourd'hui, les résultats de ces seuls tests ne peuvent être considérés pour élaborer ou modifier une stratégie thérapeutique.

Des techniques rapides sont également utilisables pour identifier une souche isolée

- Hybridation de l'ADN et de l'ARN bactérien avec une sonde marquée. Les performances de sensibilité et de spécificité des sondes commercialisées sont satisfaisantes, au moins pour les bacilles de la tuberculose, *Mycobacterium avium* et *M. gordonae*. L'identification des espèces par séquençage de fragments polymorphes de séquences conservées (A.R.N. 16S, gènes codants pour la protéine 65 kD...) nécessite un **appareillage coûteux et reste réservée à quelques laboratoires hautement spécialisés en mycobactériologie**. Diverses techniques de biologie moléculaire (hybridation ou séquençage de séquences cibles) permettent de détecter des résistances par l'identification des mutations dans les gènes codants pour les molécules cibles des antibiotiques. **L'utilisation de ces dernières méthodes reste expérimentale.**
- Détection de l'acide tuberculostéarique par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse.

Selon le ministère de la santé du Canada : "Amplification methods, if used, should be performed only in addition to microscopy and culture until they are demonstrated to be

equivalent or superior in sensitivity and specificity to culture." (Recommandations from the national consensus conference on tuberculosis, dec. 3-5, 1997)

Concernant la différenciation des différentes souches appartenant au complexe tuberculosis la société Hain Life Science a mis au point le test GenoType® MTBC basé sur la technique DNA.STRIP® (cf. annexe). Néanmoins **cette technique très coûteuse nécessite une mise en culture préalable, de plus il semble que sa sensibilité ne soit pas très bonne (V. Vincent Comm. Pers.)** et elle reste réservée au cas de tuberculose avérée où la souche est douteuse et réagit de façon incohérente aux tests de différenciation biochimique (Institut Pasteur, Paris).

5.3. Grandes lignes de l'analyse du risque pour la santé publique des deux zoonoses Tuberculose et Brucellose

5.3.1. Travail initial dans le cadre du PhD du Dr Byarugaba sur la tuberculose dans le district de Mbarara :

- Prévalence de *M. bovis* chez les patients atteints de tuberculose admis dans l'hôpital de Mbarara
- Rôle respectif de *M. bovis* et *M. tuberculosis* dans le cheptel bovin du district de Mbarara
- Facteurs de risque associés à la tuberculose humaine à *M. bovis* (population à risque ; pratiques à risque)
- Elaboration de différents scénarii et estimation quantitative (prenant en compte et la variabilité et l'incertitude) du risque
- Construction d'un outil d'aide à la gestion : l'arbre de décisions
- Proposition de recommandations à différents niveaux : consommateurs et éleveurs ; ministère de la santé publique et ministère de l'agriculture (Services Vétérinaires nationaux)

5.3.2. Initiation d'un travail du même type sur la Brucellose avec l'Université de Makéréré (MSc)

- Impact de la Brucellose chez les patients atteints d'accès fébriles (fièvre ondulante, sueur à forte odeur de paille, douleurs en particulier articulaires)
- Rôle respectif de *Brucella melitensis* et *Brucella abortus* chez les patients
- Facteurs de risque associés à la Brucellose humaine (part respective des élevages d'ovins-caprins et de bovins)
- Estimation du risque zoonotique lié à la Brucellose

5.4. Structuration des collaborations potentielles

Partenaire	Avantages	Inconvénients
Epicentre	Motivation sur le volet humain de l'étude tuberculose (en particulier rapport Tub-HIV+) Implication dans un protocole préliminaire permettant d'explorer l'étiologie de la tuberculose (bibliographie, rédaction du protocole et du budget) Présence sur Mbarara Expérience en PCR sur la malaria (adaptation nécessaire)	Motivation réduite sur le volet brucellose Expérience nulle en terme de tuberculose (analyses) Capacité de laboratoire réduite : - besoin en formation - besoin limité en matériel - besoin en terme d'amélioration des locaux (normes de biosécurité)
PACE	Motivation sur le volet humain et animal Maître d'œuvre de réseaux d'épidémiosurveillance sur plusieurs maladies de la liste A de l'OIE, pouvant être mis à disposition d'un projet tuberculose ou brucellose Sérothèque sur différentes régions d'Ouganda (Mbarara-Nord-est) remontant jusqu'en 2000 Motivation et capacité en terme d'Elisa de différenciation entre <i>M. bovis</i> et <i>M. tb.</i>	Budgétisation de la collaboration fantaisiste : possibilité de révision Expérience en terme de TB et Brucell. nulle
Nat. TB Prgr (NTBP)	Capacité et expérience en terme de mise culture du complexe <i>tuberculosis</i> Intérêt (financier ou scientifique ?) en terme de collaboration Laboratoire fonctionnel respectant les normes de biosécurité	Acheminement nécessaire des échantillons
JCRC	Compétences techniques de haut niveau (culture – PCR..) Equipement et niveau de recherche très élevés	Surcharge de travail Intérêt financier et scientifique trop marqué Capacités d'accueil et d'encadrement limitées
Université de Makéréré	Memorandum of Understanding avec le Cirad Intérêt pour l'étude de la Brucellose (Master degree of Science avec la faculté vétérinaire) Coopération initiée sur l'étude de la qualité du lait	Absence de moyens financiers
DVO	Présence d'un réseau de 40 agents (dont 20 vétérinaires) répartis dans les différentes paroisses du district. Connaissance des éleveurs Mandat national (difficilement applicable) dans la surveillance des abattages locaux	Absence de moyens financiers Absence de matériel de prélèvement et d'analyse.

Les différentes réunions de travail effectuées durant la mission ont permis de déterminer les différents partenaires avec qui il sera possible de travailler dans le cadre de

l'étude sur la tuberculose. Concernant la brucellose, une première avancée a eu lieu avec la faculté vétérinaire de l'université de Makérére mais il reste encore à définir le type et les conditions de travail attendus.

➤ **La tuberculose :**

Dans le cadre de la thèse du Dr Byarugaba et concernant le volet humain une forte implication d'**Epicentre** a été conclue de façon informelle pour l'instant. Il s'agit tout d'abord de commencer une pré-étude qui permettra d'avoir une idée de la prévalence de la tuberculose humaine due à *M. bovis*. Les suites données à cette implication d'**Epicentre** dépendront de ces résultats. Si la prévalence relative de *M. bovis* par rapport à *M. tuberculosis* est inférieure à 5% **Epicentre** n'est plus intéressé. Par contre et comme on peut le penser en particulier si on s'intéresse aux personnes immunodéprimés, si la prévalence relative de *M. bovis* est supérieure à 5% alors l'organisation **Epicentre** s'engage à poursuivre sa collaboration scientifique et technique.

Cette collaboration scientifique est pour l'instant concrétisée par le "road map" conclut avec **Epicentre** (cf. chronogramme).

Du point de vue technique, **Epicentre** possède actuellement du matériel permettant de réaliser des PCR (utilisé pour les diagnostics de paludisme pour l'instant) au sein de l'hôpital de Mbarara. Il serait possible d'utiliser ce matériel pour effectuer des PCR tuberculose. Cependant il semble pour l'instant (à confirmer) que les PCR tuberculose ne puissent être effectuées qu'après culture des prélèvements en particulier quand il s'agit de PCR de différenciation du complexe tuberculosis (cf. annexe).

Concernant les possibilités de culture des mycobactéries le **NTBP** qui possède une expérience certaine dans le domaine est prêt à accueillir le Dr Byarugaba dans ces locaux et pour ses manipulations. Au sein de ce laboratoire il sera également possible au Dr Byarugaba d'effectuer des tests biochimiques et des antibiogrammes pour le diagnostic étiologique de la tuberculose. Un accord financier (coût des réactifs, des milieux, du matériel) doit être envisagé avec le **NTBP**.

Remarque : Concernant la différenciation entre *M. bovis* et *M. tuberculosis*, il convient encore d'établir la faisabilité d'une PCR tuberculose et ensuite de comparer les coûts et les performances de cette méthode vis-à-vis des méthodes classiques biochimiques (sensibilité, spécificité). Si l'information ne peut pas être obtenue suffisamment rapidement, il faudra commencer la pré-étude en utilisant les méthodes dites classiques. (cf. chronogramme)

Pour la partie animale de la thèse, il faut que le Dr Byarugaba rentre en contact rapidement avec les acteurs du Pace, afin de connaître le protocole exact de leur enquête transversale (cf. infra) et d'identifier les éleveurs du district de Mbarara pour lesquels il faudra établir un questionnaire.

Un contact avec le Dr Sserunjoji de l'université de Makérére a été initié par le Dr Patrice Grimaud. Dans le cadre du volet produits animaux de la thèse, le travail qui va être effectué par une stagiaire du Cirad sur les produits laitiers de juin à novembre 2004 devra prendre en considération l'aspect statut vis-à-vis de la tuberculose de ces produits. Une rencontre avec la stagiaire est prévue au Cirad de Montpellier avant son départ à ce propos. De son côté le Dr Sserunjoji doit se renseigner sur les possibilités de PCR tuberculose sur le lait.

Il convient d'initier un travail identique sur la filière viande. Dans cette optique il sera possible de proposer un stage à un étudiant du Cirad pour effectuer une partie de ce

travail. Il faut également se renseigner d'une part sur les possibilités de PCR tuberculose sur la viande et d'autre part auprès des autorités compétentes sur les possibilités d'une étude de la filière viande (collecte des animaux, abattoir, circuit de distribution...).

➤ **La brucellose :**

Lors de la réunion avec le professeur Eli Katunguka-Rwakishaya (doyen de la faculté vétérinaire de Makérére), il a été convenu qu'un travail serait commencé cette année par étudiant de master sur l'étude de l'impact de la brucellose en pathologie humaine. Le 07 avril 2004, un étudiant en master de médecine vétérinaire préventive dans cette même faculté, le Dr. Edward Ssekawojwa, a pris contact avec le Dr Camus (directeur du Cirad-Emvt) afin d'obtenir un appui scientifique et financier sur son projet de thèse concernant les facteurs de risque associés à la brucellose. Une collaboration avec appui scientifique peut dès à présent être proposée à cet étudiant soit en essayant d'inclure dans son étude un aspect "impact sur la santé humaine", soit en complétant ce travail par un autre portant sur le volet humain de cette maladie.

5.5. Réseau d'épidémiosurveillance et tuberculose

Dans le cas qui nous concerne et parce que l'on traite de zoonose il faudra mettre en place un système particulier incluant une relation étroite entre vétérinaires et médecins.

Soit en prenant appui sur la structure mise en place par le PACE sur différentes maladies animales majeures (FA, PPA, RP...) soit en s'appuyant sur l'expérience de ce programme et en collaboration avec le DVO on pourra proposer une première approche au niveau du district de Mbarara. Au-delà il faut prendre conscience que c'est l'épidémiosurveillance qui permet à un pays l'acquisition du statut de territoire indemne d'une maladie (importance pour les échanges internationaux d'animaux ou de produits animaux). Néanmoins à ce niveau l'organisation est du ressort des pouvoirs publics, lesquels peuvent s'appuyer sur des organisations professionnels et des expériences concluantes à des échelles moindres.

Remarque 1 : les actions d'épidémiosurveillance peuvent tout à fait porter sur un échantillon de la population considérée sous réserve de représentativité et de tirage aléatoire. Cette méthode allie des facilités de faisabilité à une modicité de son coût.

Remarque 2 : Courant avril le PACE doit mettre en place une enquête transversale entrant dans le cadre de la séro-surveillance de la RP. Dans le district de Mbarara cette enquête va être réalisée dans chaque paroisse sur les animaux de 2-3ans d'âge. Des collectes de sérums vont être réalisées et les échantillons seront stockés au sein de la sérothèque du PACE. En accord avec les responsables du programme il semble tout à fait possible d'utiliser ces échantillons pour des analyses spécifiques dans le cadre de l'enquête sur la séroprévalence de la tuberculose.

5.6. Prophylaxie en Ouganda

En Ouganda une première étude (Castel, 2001) a montré que la prévalence animale de la tuberculose était de 6%. Dans ces conditions il est peut-être possible d'envisager une prophylaxie sanitaire si tant est que le gouvernement puisse apporter un appui financier à l'abattage des animaux contaminés. Une première étape d'essai terrain pourrait être envisagée à l'échelle du district de Mbarara, dans le cadre d'accord avec le DVO et avec un soutien financier extérieur.

Remarque : Compte tenu des problèmes de sensibilité et de spécificité de la méthode utilisée dans cette étude ($IC_{95spé}$ (0.74 ; 1) et IC_{95sens} (0.44 ; 0.98)) (Faye et al. In press) les données de prévalence sont à prendre avec beaucoup de précaution. En particulier l'IC de la sensibilité étant très important on peut penser que ces résultats cachent une forte sous estimation de la prévalence (nombreux faux négatifs). Il en résulte qu'envisager une prophylaxie sanitaire dès à présent peut paraître un peu présomptueux. Une étude plus sensible devra d'abord être menée ainsi qu'une évaluation économique de la faisabilité de ce type de prophylaxie (étude coût/bénéfice). Concernant ce dernier point il faut donc souligner le besoin d'une étude préalable sur l'impact économique de la tuberculose en élevage bovin dans le district de Mbarara pour commencer.

5.7. Besoins en formation

Les besoins en formation restent encore à définir avec les partenaires et en étroite relation avec les acteurs du dossier en particulier Frederick Byarugaba et l'étudiant devant travailler sur la tuberculose.

5.8. Besoins en infrastructure et en matériel

Le budget est en cours d'élaboration avec les différents partenaires pressentis

6. Chronogramme prévisionnel

Nous pouvons proposer le chronogramme prévisionnel suivant. La première partie fait suite aux entretiens et aux décisions prises avec Epicentre. La suite du chronogramme est à construire et à valider par les différents acteurs impliqués.

Activité	Personnes en charge	Date réalisation
Bibliographie « Tuberculose maladie animale »	Dr Eric Etter (Cirad-Emvt Montpellier)	30 avril 2004
Bibliographie « Tuberculose maladie humaine »	Dr Laurence Ahoua (Epicentre)	30 avril 2004
Transfert de documents bibliographiques au Dr Frederick Byarugaba	Dr Patrice Grimaud (Cirad-Emvt Ouganda)	Avril 2004
Contact avec le Dr. Edward Ssekawojwa	Dr Patrice Grimaud (Cirad-Emvt Ouganda)	Avril 2004
Evaluation du projet de thèse du Dr. Edward Ssekawojwa et des possibilités de soutien financier	Dr Patrice Grimaud (Cirad-Emvt Ouganda) Dr Eric Etter (Cirad-Emvt Montpellier)	Avril 2004
Etablissement d'un devis concernant les méthodes dites classiques de différenciation <i>M. bovis</i> et <i>M. tuberculosis</i>	Dr Frederick Byarugaba (Univers. Mbarara) Dr Patrice Grimaud (Cirad-Emvt Ouganda)	15 mai 2004
Calcul du coût et des moyens nécessaires (matériel) pour la PCR de différenciation <i>M. bovis</i> et <i>M. tuberculosis</i>	Dr Eric Etter (Cirad-Emvt) Dr Patrice Grimaud (Cirad-Emvt Ouganda) Dr Laurence Ahoua (Epicentre)	15 mai 2004
Elaboration du questionnaire à mettre en place auprès des éleveurs de bovins	Dr Frederick Byarugaba (Univers. Mbarara)	Mai 2004
Bibliographie de synthèse « Tuberculose : une zoonose »	Dr Frederick Byarugaba (Univers. Mbarara)	Mai 2004
Budgétisation de l'étude préliminaire (100 patients) « Etiologie de la tuberculose humaine à l'hôpital de Mbarara »	Dr Laurence Ahoua (Epicentre)	30 avril 2004
Echantillonnage pour l'étude générale sur « Etiologie de la tuberculose humaine à l'hôpital de Mbarara »	Dr Eric Etter (Cirad-Emvt)	30 avril 2004
Protocole de l'étude préliminaire « Etiologie de la tuberculose humaine à l'hôpital de Mbarara » (1 ^{er} draft)	Dr Laurence Ahoua (Epicentre)	15 mai 2004
Réalisation du travail de terrain « enquête préliminaire »	Dr Frederick Byarugaba (Univers. Mbarara)	Mi-mai à Juillet 2004

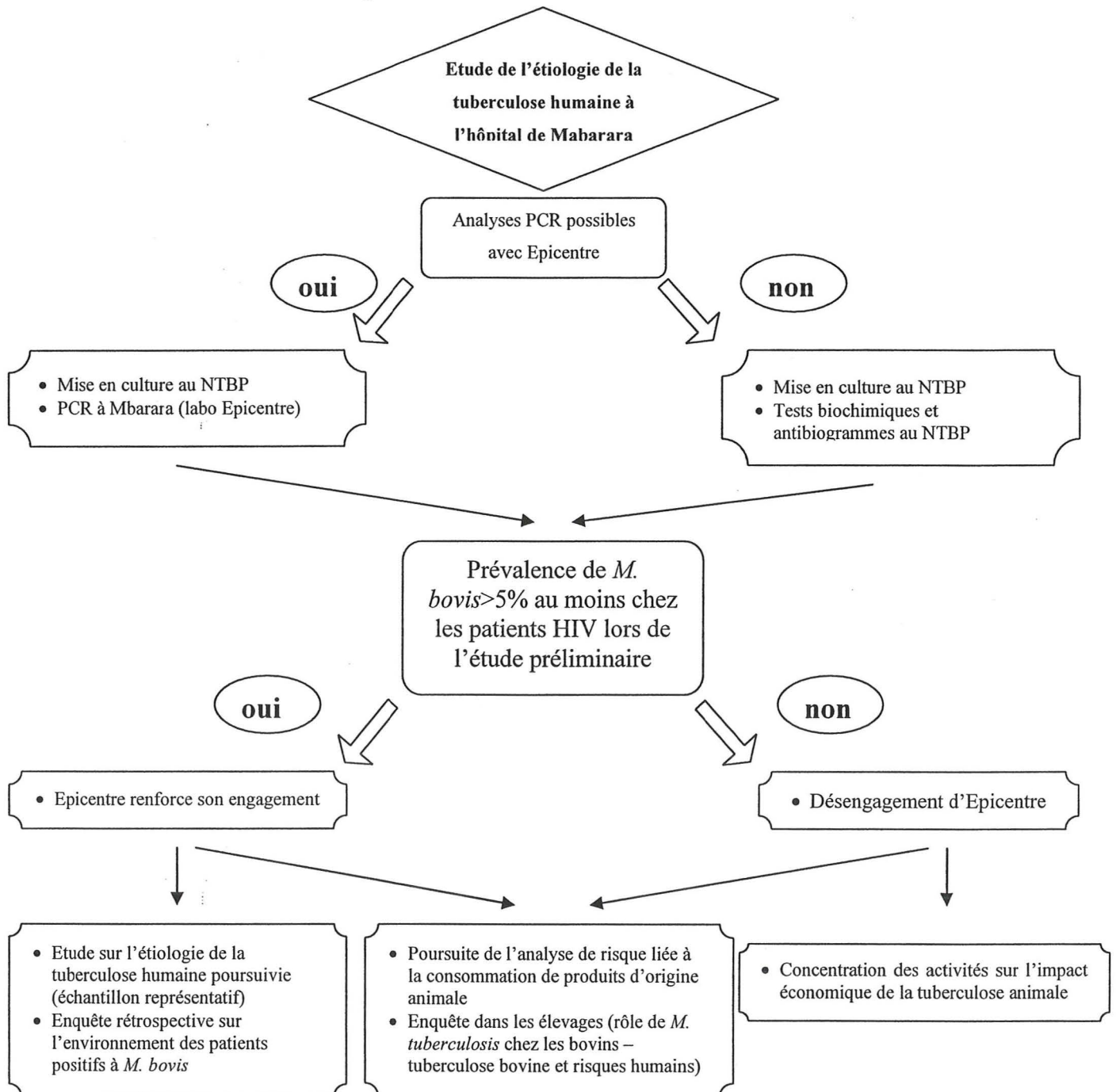
(Hôpital de Mbarara) -récolte d'échantillons et questionnaire-		
Réalisation du travail de laboratoire (type d'analyses et localisation à définir)	Dr Frederick Byarugaba (Univers. Mbarara)	Juin à Août 2004
Analyse des résultats	Dr Frederick Byarugaba (Univers. Mbarara) Assisté des Dr Eric Etter (Cirad-Emvt Montpellier) et Dr Patrice Grimaud (Cirad-Emvt Ouganda)	Août –Sept 2004
Discussion des résultats et définition de la politique de recherche à venir à envisager	Dr Frederick Byarugaba (Univers. Mbarara) Dr Eric Etter (Cirad-Emvt Montpellier), Dr Patrice Grimaud (Cirad-Emvt Ouganda), Dr Laurence Ahoua (Epicentre) et Dr Patrice Piola (Epicentre)	Fin sept 2004

7. Planning :

2004												2005												2006											
A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D			
Bibliographie																																			
Déf. Protocole 1 (budget, matériel et méthode...)																																			
Etude préliminaire hôpital Mbarara						Poursuite de l'étude						Rédaction article																							
						Discussion ; politique de recherche						D																							
Etude filière lait (Mlle Grillet)						E. filière viande																													
Déf. Protocole 2																																			
						Enquête éleveurs ("Exposés - Non exposés")												Rédaction article																	
Mission EE												M												M											
																		M												M					
																														Rédaction thèse					

Note : Aucun travaux de terrain n'est prévu pour l'instant après août 2005, en effet leurs opportunités et leurs définitions dépendront des résultats obtenus au cours des premières études (hôpital, éleveurs, filières).

8. Schéma décisionnel concernant les actions de recherche sur la Tuberculose en Ouganda



9. Propositions concernant les contributions du Cirad

- Dans le cadre de l'encadrement et du suivi du "PhD tuberculose" le Cirad propose qu'avec le relais localement du Dr Patrice Grimaud une aide puisse être apportée grâce aux compétences épidémiologiques et statistiques réunies sur Montpellier. Pour débiter une aide au travail bibliographique et à la mise au point de protocoles de recherche va être réalisée par le Dr Eric Etter. Cet appui pourra se poursuivre au moment de l'analyse des données et de l'exploitation scientifique de ces résultats. Des missions d'appui et d'évaluation du travail devront être programmées tout au long de la thèse. La fréquence pourrait être de 6 mois à réévaluer au bout d'un an en fonction de l'avancée des travaux.
- Des formations en biologie moléculaire, microbiologie, épidémiologie, statistique et analyse du risque peuvent aussi être proposée localement en fonction des besoins que le Dr Grimaud devra évaluer : missions de formateurs du Cirad à envisager.
- Il serait également profitable pour l'étudiant en thèse d'envisager son accueil sur Montpellier dans le cadre d'une formation (protocole d'accueil à élaborer) analyse du risque ou autre (besoin à définir avec lui)
- Une stagiaire du Cirad-Emvt, Nelly Grillet, doit arrivée en juin 2004 pour travailler sur la qualité dans la filière lait. Ce stage doit être l'occasion d'appréhender le danger que représentent la tuberculose et la brucellose dans cette filière. Si il ne permet d'effectuer une estimation quantitative du risque il doit au moins permettre d'initier ce travail en décomposant la filière en modules simples qui combinés permettent de proposer un ou plusieurs scénarios d'apparition du danger.
- Un stage CES ou CEAV Cirad-Emvt sur la filière viande (structuration, qualité sanitaire et législation – comportement alimentaire) doit être à envisager pour février 2005.
- L'encadrement et le suivi du "Master Degree of Science sur la Brucellose" doivent se concrétiser par une première prise de contact puis par la définition des attentes respectives. Ceci doit permettre de déboucher sur une étude préalable de l'impact de cette zoonose en santé publique, et ensuit un PhD sera envisageable en fonction des résultats.

ANNEXES

- Termes de Référence de la mission
- Redéfinition du sujet de thèse de Frederick Byarugaba
- Coloration de Ziehl et à l'auramine
- Milieu de culture liquide
- Autres techniques d'isolement et d'identification
- Résumé de l'article de Ameni et al., 2000, "Comparison between comparative tuberculin and gamma-interferon tests for the diagnosis of bovine tuberculosis in Ethiopia."
- Différenciation du complexe tuberculosis par PCR

Mission de Eric ETTER

Epidémiologiste au CIRAD EMVT

Appui à l'agent Cirad en place en Ouganda. Définition des prérequis et du cadre pour la mise en place d'une étude des risques zoonotiques de la brucellose et de la tuberculose (incluant un étudiant en PhD). Etude de faisabilité sur la mise en place des réseaux de surveillance incluant l'analyse de risque à l'échelle du district de Mbarara.

Termes de référence

CONTEXTE

Présent en Ouganda depuis 1998, le Département Emvt (Elevage et Médecine vétérinaire des Pays tropicaux) du Cirad s'est essentiellement intéressé à la production bovine laitière, au travers de missions courtes ou d'appui à des stagiaires et contractuels de courte durée. Avec la mise en place effective du FSP « Concertation agricole et Structuration des filières » en 2003, il a fait le choix d'affecter un chercheur à plein temps en Ouganda, celui-ci assurant à concurrence de 50% de son temps un appui en recherche au projet. Parallèlement à ses activités scientifiques au sein du projet FSP, ce chercheur travaille avec deux universités ougandaises dans le cadre de "Memorandums of Understanding" qui le placent en situation de "visitor scientist", et il a également pour mission de promouvoir et d'appuyer localement les actions du CIRAD, en particulier celles du département EMVT, dans la zone.

L'un des résultats majeurs des études qui ont été faites dans les élevages du bassin de Mbarara est la forte prévalence dans les élevages de deux zoonoses, la tuberculose et la brucellose, avec des pourcentages respectifs de prévalences troupeau proches de 75 et 56 %, et de prévalences animal de 6 et 16 %. De tels chiffres ont alerté les pouvoirs politiques aux niveaux les plus hauts, qui ont exprimé le souhait de connaître la part de ces maladies animales dans les pathologies humaines, et cela dans un contexte où la tuberculose pose un problème de santé publique majeur en tant que maladie opportuniste chez les malades infectés par le virus du sida.

Une telle demande implique une concertation étroite entre les services de santé publique et les professionnels de l'élevage. L'agent du Cirad en poste en Ouganda, autant à titre de participant au projet FSP que dans le cadre des accords passés avec l'Université de Mbarara, peut jouer un rôle d'intermédiation entre les différents organismes travaillant sur cette thématique.

LES ORGANISMES CONTACTES

Ministry of Agriculture Anial Industry and Fisheries (MAAIF) / PACE

Dr Risto Heinonen, conseiller technique du Pace en Ouganda
Dr Rose Ademun, vétérinaire épidémiologiste responsable du laboratoire

Le Pace met en œuvre un réseau d'épidémiosurveillance national sur la peste bovine et la fièvre aphteuse, pour lesquelles ils possèdent une base de données actualisées régulièrement.

Le District de Mbarara est concerné par ce réseau et le Pace serait prêt à l'activer sur d'autres maladies, à condition que soient financées les charges supplémentaires (prélèvements de terrain, entrée des données, ...). Le réseau est relayé sur place par le DVO, 'District Veterinary Office', visiblement de manière passive. Le Pace possède en outre une sérothèque de plusieurs milliers d'échantillons.

Sur le sujet particulier d'analyses de différenciation des souches de mycobactéries, le Pace est prêt à mettre à disposition son laboratoire dans la mesure où une partie devrait en être restaurée et où le matériel, qu'elle propose d'acquérir dans ce but (Quantiferon TB, selon une technique Elisa), serait financé.

Mbarara University of Science and Technology

Très sensible aux conclusions des travaux du Cirad sur la tuberculose animale ainsi qu'à l'étude du lien tuberculose bovine / tuberculose humaine, le Vice-Chancelier de l'Université a confié un sujet de doctorat à l'un de ses enseignants du service de microbiologie, le docteur vétérinaire Frederick Byarugaba, qu'il a placé sous la supervision du chercheur Cirad en poste en Ouganda. Un document de présentation a été élaboré, le sujet précis étant 'Etude des facteurs influençant la qualité et l'hygiène des produits bovins (viande et lait) : *Mycobacterium bovis* joue-t-il un rôle dans l'étiologie de la tuberculose humaine dans le district de Mbarara ?'.

L'étude repose sur le suivi de patients accueillis dans le service de tuberculose de l'hôpital de Mbarara (même campus que l'université) avec un protocole à mieux détailler dont les grandes lignes sont (1) confirmation du diagnostic de tuberculose (Zielh-Nielsen); (2) envoi de prélèvements au laboratoire de Kampala pour mise en culture et différenciation des espèces de mycobactéries, et (3) confirmation de la souche par PCR dans le laboratoire Epicentre présent à l'Université. Elle se double d'un questionnaire détaillé pour chacun des patients.

Epicentre a été sollicité par le docteur Byarugaba sur la faisabilité de l'utilisation du matériel PCR pour la tuberculose, qui n'a pas eu à ce jour (fin février 2004) de réponse.

Epicentre

Association loi de 1901, financée à 95 % par MSF, et statut d'assimilée ONG.

Deux médecins épidémiologistes placés à Kampala, Patrice Piola (représentant Epicentre en Ouganda) et Laurence Ahoua (arrivée récemment et plus disponible), qui travaillent essentiellement sur le sida et le paludisme.

Une antenne à Mbarara, au sein de l'Université, avec un médecin épidémiologiste et deux techniciens formés en France aux techniques de la PCR, dont ils possèdent le matériel pour les études qu'ils conduisent sur le paludisme.

Favorables à une collaboration sur l'étude de la tuberculose mais demandent une estimation préalable du nombre de cas de tuberculose humaine due à *Mycobacterium bovis* avant consultation de leur hiérarchie en France et participation à un 'consortium' demandeur de financements à l'Union Européenne. Mettent en garde contre la sanction du comité national

d'éthique (parler de 'survey' et non de 'study', vérifier sur le 'guideline' relatif à la tuberculose disponible au Ministère de la Santé les termes utilisés, ...).

National Tuberculosis and Leprosy Programme

Ce laboratoire, qui dépend du Ministère de la Santé, est situé à Kampala et est dirigé par Gaspard Guma, qui prétend qu'en l'état actuel il n'est pas en mesure d'effectuer la différenciation entre *M. tuberculosis* et d'autres *Mycobacterium*, mais qu'un simple approvisionnement en réactifs lui permettrait d'y procéder.

Autres interlocuteurs à contacter

Ministry of Health	: Dr Ambrose Talisuna, Ag Assistant Commisioner (Epidemiology and Surveillance)
Tuberculosis Programme	: Dr Francis Adatu, Manager
National Disease Control	: Dr Lwamafa, Commissioner

OBJECTIFS DE LA MISSION

L'objectif de cette mission est pour un expert du Cirad-Emvt d'apporter un appui technique en particulier dans les domaines suivants :

- TDR 1. Elaboration d'un protocole d'étude du risque de la transmission de la tuberculose et de la brucellose à l'homme
- TDR 2. Formation :
 - a. - Evaluation du sujet de thèse d'un PhD à l'Université de Mbarara
 - b. - Aide au ciradien en poste dans le cadre de son affectation à l'Université de Mbarara (notamment par l'apport de support de conférences; ...)
- TDR 3. Identification des partenaires de l'étude et des tâches dévolues à chacun d'entre eux
- TDR 4. Evaluation des outils existants et des besoins pour la réalisation de l'étude
- TDR 5. Etude de l'insertion des outils identifiés dans la mise en place d'un réseau d'épidémio-surveillance à l'échelle du district

METHODOLOGIE

Afin de répondre à ces objectifs, la mission propose d'effectuer les points suivants :

- Rencontre et entretiens avec les responsables de la formation à l'Université de Mbarara
- Visite des différentes zones où doit être menée l'étude avec l'agent du Cirad Emvt en poste : évaluation des besoins en terme de suivi des réseaux d'épidémiosurveillance et de surveillance de la tuberculose et de la brucellose
- Rencontre avec les différents partenaires identifiés et présentations de lignes directrices de l'étude et de leur rôle respectif dans cette étude

- Participation à l'amélioration du sujet de thèse de l'étudiant et étude de faisabilité technique de cette thèse
- Exposé des formations pouvant être proposées par le Cirad-Emvt et dispensée par l'agent local

RESULTATS ATTENDUS

Au terme de cette mission :

- le sujet de PhD sera clairement défini
- les partenaires seront tenus informés et un plan de motivation sera élaboré
- un plan d'actions pour débiter ce travail sera proposé pour une mise en œuvre immédiate ; les procédures d'enquête, de récolte des données, d'échantillonnage, ainsi que le rôle de chacun des partenaires et les moyens (techniques, humains, financiers...)... seront définis
- des documents relatifs aux indicateurs de performance seront proposés
- Des propositions de stratégie de contrôle et de la lutte contre la tuberculose et la brucellose seront élaborées, en mettant en évidence les points essentiels concernant la récolte de données sanitaires, le développement d'un guide de surveillance, et leur rapport avec l'action de l'OIE
- les besoins nationaux et régionaux en matière de formation continue seront définis et le niveau d'implication du Cirad-Emvt dans l'organisation ou la participation à ces activités de formation sera précisé.

DEROULEMENT DE LA MISSION

Cette mission se déroulera à Kampala et à Mbarara (Ouganda) du 19/03/2004 au 26/03/2004, selon le programme prévisionnel suivant :

Vendredi 19 mars : accueil P. Grimaud

Samedi 20 mars : Kampala

Ambassade de France

Scac

Projet FSP

Dimanche 21 mars : Départ pour Mbarara

17 heures : Frederic Byarugaba

Lundi 22 mars : Mbarara

Matin : DVO ; MUST ; Hôpital

Après-midi : Visites d'élevage

Mardi 23 mars : Retour de Mbarara

Après-midi : PACE (Entebbe)

Mercredi 24 mars : Kampala

Matin : Services du Ministère

Après-midi : Makerere University (Faculté vétérinaire)

Jeudi 25 mars : Kampala

Matin : Epicentre

Après-midi : FSP / Cirad

Vendredi 26 mars : Kampala

Matin : Restitutions

Après-midi : Départ pour Entebbe

**Risk assessment in the zoonotic problematic of tuberculosis (*Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*) in Mbarara district:
Role of animal and animal products in the tuberculosis inter-specific barrier crossing.**

1. Role of *Mycobacterium bovis* in the aetiology of tuberculosis in human patients in the hospital of Mbarara
2. Respective role of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in the aetiology of tuberculosis in Mbarara district
3. Risk factors associated with human tuberculosis by *Mycobacterium bovis*
4. Risk population (HIV+ ; Teenagers, Job disease...)
5. Risk practice (Milk consumption, meat consumption, breeding practice...)
6. Risk assessment: elaboration of different scenarii and quantitative estimation of risk including estimation of both incertitude and variability. Sensitivity of the model.
7. Decision tools: decision tree
8. Recommendations different levels:
9. Breeders
10. National Veterinary Service
11. Consumers
12. Human Health department

More details:

- I. Comparison of different test to distinguish M.b. and M.t. :
 - Se and Sp of each techniques with knowledge of the patient status (RX, Clinical diagnostic)
 - Se and Sp without gold standard
 - Comparison of the different test for M.b. /for M.t.

Tune up of a PCR technique in Uganda to separate M.b. and M .t. → Ref. method

→ Comparison of each test with the Ref. method

Result of the human analysis regarding the questionnaire data
- II. Survey with SVO in fields + questionnaire with breeders (role of dogs and cats ?)
- III. Survey with the hospital patients
 - Survey of the milk commodity chain (consumers, practice and sanitary status...)
 - Survey of the meat commodity chain (actors of the filiere...)

Coloration de Ziehl-Neelsen – Coloration à l'auramine

Coloration de Ziehl-Neelsen : après action de la fuchsine à chaud (technique rapide) ou à froid (technique lente), on traite la préparation par l'acide nitrique puis par l'alcool. Tous les éléments non alcool-acido résistants sont alors décolorés. On surcolore le fond par le bleu de méthylène et les bacilles alcool-acido résistants (BAAR) apparaissent en rouge sur fond bleu.

Si on remplace la fuchsine par de l'auramine, qui est un composé fluorescent, les BAAR apparaissent, en lumière ultraviolette, brillants sur un fond sombre et sont de ce fait plus facilement détectables.

Milieu de culture liquide

De plus en plus, les centres hospitaliers utilisent un milieu liquide qui permet la détection du bacille tuberculeux une à deux semaines plus tôt que les systèmes conventionnels. Les systèmes couramment utilisés sont le Bactec_{md} et le Mycobacteria Growth Indicator Tube_{md} (MGIT). De plus en plus, les intervenants de santé publique entendront dire que le Bactec_{md} ou le MGIT_{md} est positif et que la présence de bacilles tuberculeux est confirmée par le test NAP.

Le système Bactec_{md} contient de l'acide palmitique marqué au carbone 14 (radioactif). Les mycobactéries utilisent et transforment l'acide palmitique pour leur métabolisme et libèrent donc du ¹⁴CO₂ (gaz carbonique radioactif) qui sera détecté par l'appareil Bactec_{md}. Lorsqu'une croissance est détectée par l'appareil, on s'assure que la mycobactérie qui pousse est bien du complexe *Mycobacterium tuberculosis* en procédant en parallèle à une épreuve de confirmation. On ajoute au milieu liquide du nitro- α -acétylamino- β -hydroxypropionophénone (test NAP) qui inhibe la croissance des mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* seulement. Si la croissance se poursuit, c'est qu'on est en présence d'une autre mycobactérie.

Autres techniques d'isolement et d'identification

Ces dernières années, des méthodes rapides se sont développées.

- système biphasique

Il est composé d'un flacon de milieu liquide (7H) surmonté de lames de milieux solides. L'échantillon est introduit dans le flacon et après 48 heures, les milieux solides sont ensemencés par retournement. Le système détecte *Mycobacterium tuberculosis* en une vingtaine de jours. **Cette méthode nécessite un matériel coûteux et ne permet pas la distinction entre *M. bovis* et *M. tuberculosis*.**

- méthode respirométrique

La détection rapide de la croissance fondée sur la mesure du taux de CO₂ produit par le métabolisme bactérien en utilisant une méthode radiométrique ou photométrique se fait en une quinzaine de jours. Cette technique peut être utilisée pour réaliser les antibiogrammes.

Cette méthode nécessite un matériel coûteux et des conditions de sécurité importantes (utilisation de produits radioactifs) de plus elle ne permet pas la distinction entre *M. bovis* et *M. tuberculosis*.

- méthode chimique

Une méthode chromatographique analyse les acides mycoliques de la paroi dont le profil est caractéristique des différentes espèces. Le coût de la chromatographie est cependant très élevé.

Biologie moléculaire

Des techniques d'amplification d'acides nucléiques (ADN ou ARN) existent comme moyen de détection directe très rapide des micro-organismes dans les spécimens cliniques. Les deux principales techniques utilisées aujourd'hui sont la PCR (polymerase chain reaction : réaction de polymérase en chaîne) de Roche Diagnostic Systems (test AMPLICOR ou COBAS) et la TMA (transcription mediated amplification : amplification par l'entremise d'une transcription) de Gen-Probe, commercialisée sous le nom MTD (pour *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test). Elles permettent de détecter le complexe *M. tuberculosis* (comprenant *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG et *M. africanum* chez les humains ainsi que *M. microti*, pathogène animal, mais rapporté pour la première fois en 1998 chez l'humain) avec une sensibilité de l'ordre de 95 % et une spécificité de près de 100 % dans les spécimens d'origine respiratoire à frottis positif. Si le frottis est négatif, indice d'un plus petit nombre de bacilles, la sensibilité diminue à environ 65 %. La présence de substances inhibitrices dans certains spécimens peut aussi empêcher la détection des acides nucléiques. Les deux techniques mentionnées permettent par contre de détecter ces inhibiteurs pour une meilleure interprétation des résultats. On ne peut donc pas exclure définitivement un diagnostic de tuberculose même si le test d'amplification des acides nucléiques est négatif.

Comité sur l'immunisation du Québec, Sous-comité sur la tuberculose, Révision 2000

Ameni G, Miorner H, Roger F, Tibbo M.

Comparison between comparative tuberculin and gamma-interferon tests for the diagnosis of bovine tuberculosis in Ethiopia.

Trop Anim Health Prod. 2000 Oct;32(5):267-76.

A study to determine and compare the sensitivities and specificities of the comparative cervical tuberculin (CCT) and gamma-interferon (IFN-gamma) tests for the diagnosis of bovine tuberculosis was conducted on 30 zebu oxen. The results of the tests were compared with the presence of acid-fast bacilli found by bacteriological culturing and histopathological examinations. The sensitivity and specificity of CCT test were found to be 90.9% and 100%, respectively. Those of the commercial IFN-gamma test were determined to be 95.5% and 87.7%, respectively. No significant differences were found between the sensitivities (Yates' corrected chi 2 = 0.32; p = 0.57) or the specificities (Yates' corrected chi 2 = 2.54; p = 0.11) of the two tests. Furthermore, a positive correlation (r = 0.76) was recorded between the increase in skin thickness following injection of bovine purified protein derivative (PPD) and the optical density in the gamma-interferon assay with bovine PPD. On the other hand, the correlation (r = 0.47) between the change in skin thickness following injection of avian PPD and the optical density in the gamma-interferon assay with avian PPD was relatively weak. On the basis of this preliminary investigation, it was concluded that the choice between the two tests depends on their cost and simplicity and on livestock management and time factors rather than on their respective diagnostic value.

PMID: 11059035 [PubMed - indexed for MEDLINE]

GenoType® MTBC
<http://www.biocentric.com>

Test génétique de différenciation des mycobactéries appartenant au complexe tuberculosis à partir d'une culture.

Principe

Le test **GenoType® MTBC** est basé sur la technique **DNA'STRIP®** qui permet la différenciation génétique des espèces/souches appartenant au complexe tuberculosis :

M. africanum (I), *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. caprae*, *M. microti*, *M. tuberculosis* / *M. canettii* / *M. canettii* ssp. lisse tuberculosis variant 2 / (*M. africanum* II ^a), *M. canettii* ssp. lisse tuberculosis variant 1. La procédure complète comporte trois phases : extraction de l'ADN à partir de la culture d'une mycobactérie (matériel requis pour l'extraction de l'ADN non fourni), amplification à l'aide d'amorces biotinyllées (ADN polymérase thermostable non fournie) et détection de l'ADN amplifié par hybridation inverse. Cette dernière phase comporte les étapes suivantes : dénaturation chimique de l'ADN amplifié, hybridation des amplicons simples brins biotinyllés aux sondes pré-immobilisées sur la membrane, lavage stringent et enfin addition d'un conjugué streptavidine / phosphatase alcaline suivie d'une révélation chromogénique. Les signaux obtenus sont facilement et rapidement interprétés à l'aide d'une matrice fournie avec chaque trousse.

^a Statut de *M. africanum* : grâce aux travaux de Viana-Niero et coll. publiés en 2001 (J. Clin. Microbiol 39: 57–65) : des caractéristiques génétiques constantes de ces bacilles ont été décrits, notamment un motif signature spécifique de spoligotypage (absence des régions 8, 9 et 39). Depuis de nouveaux espaceurs ont été décrits par Van Embden et coll. Les CNR Pasteur ont entrepris une étude des souches classées comme *M. africanum* par l'analyse de 43 espaceurs traditionnels et 25 nouveaux espaceurs (2003 J. Clin. Microbiol 41.3: 1345–1348). Les résultats associés à ceux obtenus par l'étude des régions de délétions et des SNPs permettent de mieux discriminer les souches du complexe *M. tuberculosis* notamment *M. africanum*. *Mycobacterium africanum* serait un intermédiaire entre *M. tuberculosis* et *bovis*. Les souches de l'ouest (nommées *africanum type I*) sont plus proches de *M. bovis* et aujourd'hui, **génétiquement : *M. africanum***. Les souches de l'est (nommées *africanum type II*) sont plus proches de *M. tuberculosis* et peuvent présenter des mutations ponctuelles : aujourd'hui, **génétiquement ce sont des *M. tuberculosis***.

Précautions

Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux et être manipulés comme tel. Les échantillons prélevés sur des patients à risques doivent être identifiés et manipulés dans des conditions de sécurité adéquates. Suivre les recommandations (fédérale, nationale, locale) d'hygiène, de sécurité et d'environnement. Se protéger à l'aide de vêtements adéquats et de gants.

Lors de la manipulation du kit, tenir compte des indications de sécurité suivantes :

La Solution de Dénaturation (**DEN**) contient de la soude (NaOH <2%) qui est irritante pour la peau et les yeux (R36/38 et S26, S37/39, S45).

Le substrat Concentré (**SUB-C**) contient du Diméthyl Sulfoxyde qui est irritant (R36/37/38 et S23/26/36).

Pour des informations supplémentaires, consulter les fiches de sécurité.

Contrôle de Qualité

Afin de contrôler le bon déroulement du test et le bon fonctionnement des réactifs, chaque bandelette comporte deux zones de contrôle :

- Une zone "Contrôle Conjugué" (**CC**) pour confirmer la fixation du conjugué sur la bandelette et le bon déroulement de la révélation chromogénique.
- Une zone de "Contrôle Universel" (**UC**) qui détecte toutes les mycobactéries connues ainsi que les bactéries à gram positif, riches en G+C.

Procédure

Préparation

Préchauffer un bain-marie agitant à exactement **45°C** (+/- 1°C).

Préchauffer les solutions **HYB** et **STR** entre 37 et 45°C avant de les utiliser.

Les réactifs ne doivent pas présenter de précipité (à noter cependant que la solution **CON-D** est opaque). Si besoin, l'agiter.

Remettre à température ambiante les autres réactifs (à l'exception des solutions **CON-C** et **SUB-C** qui devront être diluées au 1/100^{ème}).

Dans un tube approprié, diluer le Conjugué Concentré (**CON-C**, orange) au 1/100^{ème} :
pour chaque échantillon testé, ajouter 10 µl de solution **CON-C** à 1 ml de tampon Conjugué (**CON-D**).
Homogénéiser et conserver à température ambiante.

Dans un tube approprié, diluer le Substrat Concentré (**SUB-C**, jaune) au 1/100^{ème} :
pour chaque échantillon testé, ajouter 10 µl de solution **SUB-C** à 1 ml de tampon Substrat (**SUB-D**).
Homogénéiser. Conserver à température ambiante et à l'obscurité.

Marquer les puits utilisés à l'aide d'un feutre résistant à l'eau.

1. Déposer 20 µl de Solution de Dénaturation (**DEN**, bleu) à une extrémité de chaque puit utilisé.
2. Ajouter dans la solution de dénaturation 20 µl d'échantillon amplifié et mélanger les 2 solutions par pipetages successifs. Incuber 5 minutes à température ambiante. Pendant ce temps, à l'aide d'une pince, sortir du tube le nombre approprié de bandelettes (**STRIPS**), et écrire leur numéro d'identification à l'aide d'un crayon dans l'espace situé sous la ligne colorée. Toujours porter des gants pour manipuler les bandelettes.
3. Ajouter dans chaque puit 1 ml de Tampon d'Hybridation (**HYB**, vert) préchauffé et homogénéisé. Eviter les éclaboussures vers les autres puits.
4. Homogénéiser la solution d'hybridation ajoutée dans les puits jusqu'à ce que le mélange obtienne une coloration homogène (éviter les éclaboussures vers les autres puits).
5. Déposer une bandelette dans chaque puit utilisé. Les bandelettes doivent être entièrement recouvertes par le liquide, avec la face sensibilisée (identifiable par la ligne colorée) tournée vers le haut. Les bandelettes mal orientées doivent être remises en position à l'aide de pincettes propres. Afin d'éviter toute contamination, bien nettoyer les pincettes après chaque utilisation.
6. Placer la plaque dans un bain-marie agitateur et incuber 30 minutes à 45°C. Sélectionner une fréquence d'agitation suffisante pour assurer un bon brassage du tampon. Ajuster le niveau de l'eau dans le bain-marie agitateur à mi-hauteur des puits de façon à assurer un bon transfert de chaleur.
7. Aspirer le contenu des puits.
Utiliser par exemple une pipette pasteur reliée à une pompe à vide.
8. Ajouter à chaque puit 1 ml de Solution de Lavage Stringent (**STR**, rouge) et incuber 15 minutes à 45°C dans le bain-marie agitateur.
9. **A partir de cette étape, travailler à température ambiante et sur un agitateur plan** (orbital, linéaire ou oscillant).
Eliminer la Solution de Lavage Stringent. Utiliser avec une pipette pasteur reliée à une pompe à vide.
Eliminer tout le liquide résiduel en retournant les puits sur du papier absorbant
10. Laver en ajoutant dans chaque puit 1 ml de Solution de Rinçage (**RIN**) et incuber pendant une minute sous agitation. Eliminer tout le liquide résiduel avec une pipette pasteur reliée à une pompe à vide ou en retournant les puits sur du papier absorbant.

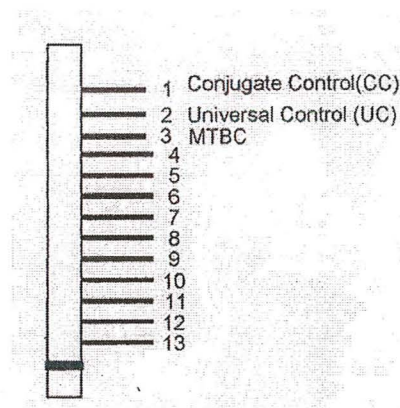
- 11. Ajouter à chaque puit 1 ml de Conjugué dilué (**CON-D**) et incuber sous agitation 30 minutes.
- 12. Aspirer le contenu des puits. Laver en ajoutant 1 ml de Solution de Rinçage (**RIN**) et incuber pendant une minute sous agitation. Répéter ce rinçage une nouvelle fois, puis rincer une fois en distribuant environ 1 ml d'eau distillée à l'aide d'une pissette. Aspirer le contenu des puits et bien éliminer toute trace d'eau dans les puits après cette dernière étape en retournant les puits sur du papier absorbant.
- 13. Ajouter 1 ml de Substrat dilué (**SUB-D**) dans chaque puit. **Incuber sans agitation et à l'obscurité pendant 5 minutes.**
Le temps de révélation peut varier en fonction des conditions de déroulement du test (de 3 à 20 minutes), notamment de la température de la pièce. Des temps de révélation trop longs peuvent entraîner un bruit de fond qui peut gêner l'interprétation des résultats.
- 14. Arrêter la réaction en rinçant brièvement deux fois à l'eau distillée.
- 15. A l'aide de pincettes, récupérer les bandelettes et les sécher à l'obscurité entre deux couches de papier absorbant.

Lecture et Interprétation des Résultats

Une matrice est fournie avec la trousse, mais elle peut également être téléchargée à l'adresse suivante :

http://www.hain-lifescience.de/pdf/mtbc_evaluation.pdf. Sur la feuille prévue à cet effet, coller les bandelettes dans leur emplacement réservé en alignant les bandes CC et UC. Noter les bandes positives dans l'avant-dernière colonne et déterminer l'espèce correspondante à l'aide du tableau d'interprétation. Noter le résultat dans la dernière colonne.

Utilisation de la matrice : celle-ci permet également de déterminer l'espèce en alignant de la même façon les bandes CC et UC des bandelettes et de la matrice. Chaque bandelette contient 13 zones réactionnelles :



Contrôle Conjugué (CC)

Une ligne colorée doit se développer dans cette zone. Cette ligne témoigne de la bonne fixation du conjugué et le bon déroulement de la révélation.

Contrôle Universel (UC)

Dans cette zone sont détectées toutes les mycobactéries connues ainsi que les bactéries à gram positif avec un fort contenu en G+C. Lorsque cette zone et la zone Contrôle Conjugué développent une ligne colorée alors que le reste du profil ne permet pas d'identifier spécifiquement cette mycobactérie, celle-ci devra être identifiée par d'autres méthodes : biochimiques ou autres techniques de PCR dans un centre de référence (Institut Pasteur : spoligotyping par exemple).

Seules les lignes colorées d'intensité au moins égale ou supérieure à celle du Contrôle Universel (UC) doivent être prises en compte pour l'interprétation.

D'autres bandes peuvent occasionnellement apparaître, lorsqu'une quantité importante d'amplicons a hybridée (voir paragraphe "causes d'erreurs").

MTBC (bande 3)

Une hybridation positive dans cette zone (ligne colorée au niveau de la bande 3) détecte toutes les mycobactéries connues appartenant au complexe tuberculosis.

Bandes 4-13

Sondes spécifiques : utiliser le tableau ci-dessous pour interpréter les résultats.

Tableau d'interprétation

	<i>Mycobacterium</i>						
	<i>tuberculosis</i> <i>canettii</i> <i>canettii</i> ssp. lisse tub. var. 2 _b (<i>africanum</i> II ^a)	<i>africanum</i> (I)	<i>microti</i>	<i>bovis</i>	BCG	<i>caprae</i>	<i>canettii</i> ssp. lisse tuberculosis variant 1 ^b
1	X	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X	X
3	X	X	X	X	X	X	X
4	X	X	X	X	X		X
5	X	X	X			X	X
6	X	X	X				X
7	X	X		X	X	X	
8	X						X
9				X	X		
10		X	X	X	X	X	
11			X				X
12						X	
13					X		

X : Signal positif.

Bande n° 1 : Contrôle Conjugué (CC).

Bande n° 2 : Contrôle Universel (UC).

Bande n° 3 : bande spécifique de MTBC.

^b *M. canettii ssp. lisse tuberculosis* : variant 1 et 2 (identification confirmée par spoligotyping, DrRflp et Is6110 au **CNR des mycobactéries : Institut Pasteur Paris**).

Limitations

Pour l'amplification, l'ADN de la mycobactérie doit être extrait à partir d'une culture isolée d'un milieu solide ou liquide et à l'aide d'une méthode appropriée (voir technique extraction et amplification de l'ADN).

L'ADN cible doit avoir été correctement amplifié.

Le test fonctionne uniquement dans la limite des régions génomiques choisies pour la différenciation du complexe *M. tuberculosis*. Le séquençage ou l'analyse des résistances aux antibiotiques doivent être réalisés séparément.

Causes d'erreurs

Résultats faibles ou absence de signal (incluant la zone Contrôle Conjugué)

- Température ambiante trop basse ou les réactifs ne sont pas restés assez longtemps à température ambiante.
- CON-C et/ou SUB-C trop dilués ou CON-D et/ou SUB-D utilisés sans dilution préalable.

Résultats faibles ou absence de signal, excepté dans la zone de contrôle conjugué

- La qualité et/ou la quantité de l'ADN extrait n'ont pas permis une amplification correcte. Analyser l'ADN amplifié sur un gel d'agarose 2%. Si aucun amplicon n'est visible, recommencer les étapes d'extraction et d'amplification. Essayer éventuellement une autre méthode d'extraction de l'ADN.
- Température du bain-marie trop élevée.

Coloration non homogène

- Les bandelettes n'ont pas été suffisamment immergées lors des différentes incubations.
- Le portoir n'a pas été correctement agité.

Bruit de fond important

- Les solutions CON-C et/ou Substrat SUB-C étaient trop concentrées.
- Les étapes de lavage n'ont pas été correctement effectuées.
- Les solutions de Lavage ou de Rinçage étaient trop froides lors de leur utilisation.

Profil obtenu différent des profils indiqués dans le tableau d'interprétation

- Mauvaise température d'incubation (vérifier le bain-marie).
- Tampon d'hybridation et/ou Solution de Lavage Stringent n'ont pas été préchauffés assez longtemps ou ont été mal homogénéisés.
- Eclaboussures pendant l'addition de la solution d'Hybridation (HYB).
- La rapidité et l'intensité du développement coloré sont fonction de la quantité d'ADN amplifié et des conditions de réaction. En cas de développement coloré rapide, l'incubation du substrat doit être arrêtée dès que les signaux sont clairement visibles, afin de prévenir toute hybridation croisée.
- Contamination de l'ADN extrait et/ou des réactifs d'amplification avec de l'ADN précédemment extrait et/ou amplifié. Si les réactifs d'amplification sont contaminés, un contrôle négatif (eau distillée stérile) entraîne également le développement de bandes colorées.
- La culture de départ n'est pas pure.
- La mycobactérie isolée ne peut pas être identifiée par ce test. Cette souche devra être identifiée par d'autres méthodes : biochimiques ou autres techniques de PCR par un centre de référence (Institut Pasteur, spoligotyping par exemple).

Références

- Kasai, H., Ezaki, T., Harayama, S. (2000): Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their gyrB sequences. J. Clin. Microbiol. 38: 301–308.
- Niemann, S., Harmsen, D., Rüsche-Gerdes, S., Richter, E. (2000): Differentiation of clinical Mycobacteria tuberculosis complex isolates by gyrB DNA sequence polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol. 38: 3231-3234.
- Niemann, S., Harmsen, D., Rüsche-Gerdes, S., Richter, E. (2000): Differentiation of clinical Mycobacteria tuberculosis complex isolates by gyrB DNA sequence polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol. 38: 3231-3234.

Composition du kit

	Quantité
Bandelettes sensibilisées avec les sondes spécifiques (STRIPS).	12
Mélange PN (PNM) Contient les amorces spécifiques, nucléotides, colorant.	0,5 ml
Solution de Dénaturation (DEN) <i>prête à l'emploi</i> Contient NaOH <2%, colorant.	0,30 ml
Solution d'Hybridation (HYB) <i>prête à l'emploi</i> Contient 8 à 10% de détergent anionique, colorant.	20 ml
Solution de Lavage Stringent (STR) <i>prête à l'emploi</i> Contient >25% d'un sel d'ammonium quaternaire, <1% détergent anionique, colorant.	20 ml
Solution de Rinçage (RIN) <i>prête à l'emploi</i> Milieu tamponné, <1% NaCl, <1% détergent anionique.	50 ml
Conjugué (CON-C) <i>concentré</i> Contient de la phosphatase alcaline conjugué à la streptavidine, colorant.	0,2 ml
Tampon Conjugué (CON-D) Milieu tamponné, 1% agent bloquant, <1% NaCl.	20 ml
Substrat (SUB-C) <i>concentré</i> Contient du Dimethyl Sulfoxide, composé chromogénique.	0,2 ml
Substrat (SUB-D) <i>prêt à l'emploi</i> Milieu tamponné, <1% NaCl, <1% MgCl ₂ .	20 ml
Manuel d'utilisation, portoir, matrice, feuille de lecture.	1 de chaque

Matériel requis mais non fourni

- Bain-marie agitateur (type TwinCubator®)
- Pipettes réglables pour 10, 20, 200, et 1000 µl
- Thermomètre calibré
- Gants à usage unique
- Embouts de pipettes (de préférence stériles avec filtre)
- Eau distillée ou désionisée
- Eprovette
- Papier absorbant
- Agitateur plan (orbital, linéaire ou oscillant)

- Chronomètre
- Pincettes

Données techniques

- *Echantillon requis* : culture bactérienne
 - *Volume nécessaire* : 20 µl de solution d'ADN amplifié par échantillon
 - *Durée du test* : approximativement 2 heures
 - *Conservation* : réfrigérateur (2 à 8°C). Pour une utilisation au delà de 4 semaines, il est recommandé de conserver le mélange PN à -20°C.
-
- Référence : 301 (12 tests)
 - Référence : 30196 (96 tests)

Fabriqueur : Hain Lifescience GmbH, Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Allemagne.

<http://www.hain-lifescience.de>